Ein Beitrag zur Kenntnis der Toxine gewisser hämolysierender Streptokokken

---

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

OTTO H. TÖNSMANN
aus Sullana, Peru.

MARBURG-L.
Druckerei Bauer
1 9 2 9

Angenommen am: 10. XII. 1929

Referent: Professor Schmidt
Korreferent: Professor Versé

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Ein Beitrag zur Kenntnis der Toxine gewisser hämolysierender Streptokokken.

Schon früh haben Kliniker bei schweren Streptokokkenerkrankungen an die ursächliche Bedeutung der Streptokokken-Toxine gedacht, besonders bei solchen Erkrankungen, bei denen das schwere klinische Bild in keinem richtigen Zusammenhang mit der lokalen Läsion zu stehen schien. Dies trifft besonders für den Zusammenhang zwischen der Streptokokken-Angina und dem Scharlach zu, so daß man schon früh den Streptokokken für die Aetiologie des Scharlachs eine große Rolle zuerkannte. So nahmen Grabritschewsky und Moser an, daß der im Gefolge von Streptokokken-Anginen auftretende Scharlach bedingt sei durch die Reaktion des Organismus auf Streptokokken-Toxine und beschritten daraufhin auch folgerichtig den Weg zu einer aktiven Immunisierung durch abgetötete Kulturen von hämolysierenden Streptokokken und zu einer passiven Immunisierung mit antitoxischen Seren gegen deren Kulturgifte.

Ueber die ätiologische Rolle der Streptokokken bei Scharlach wurde zwar in der folgenden Zeit viel diskutiert, doch wurde das allgemeine Interesse auf das Problem der Aetiologie des Scharlachs erst durch die neuen Untersuchungen des amerikanischen Ehepaares Dick gelenkt, die sich auf Grund ihrer Versuche sehr entschieden für die Streptokokken-Aetiologie des Scharlachs eingesetzt haben.

Es entstand in der Folge eine Hochflut von Arbeiten über die Streptokokken beim Scharlach und besonders über die Rolle der löslichen Toxine der Streptokokken auf Mensch und Tier.

Ohne auf die einzelnen Arbeiten näher einzugehen, sei hier nur erwähnt, daß der 1928 stattgefundene Deutsch-Russische Scharlach-Kongreß in Königsberg, an dem die Mehrzahl der auf diesem Gebiete tätigen deutschen und russischen Forscher teilnahm, zu dem Ergebnis gelangte, daß die Aetiologie des Scharlachs ein noch ungelöstes Problem darstellt, daß aber zweifellos für die Pathogenese des Scharlachs die Streptokokken die Hauptrolle spielen.

Man hat aber in der Zwischenzeit gelernt, die Streptokokken mit Berücksichtigung ihrer Toxinbildung mehr zu differenzieren. Als pathogenetisch für den Scharlach, wie wohl überhaupt als pathogenetisch für den Menschen kommen nur hämolysierende Streptokokken in Frage. — Von diesen hämolysierenden Streptokokken gibt es einige Stämme, die besonders leicht beim Wachstum auf flüssigen Nährboden Bildung von Toxinen bewirken. — Es ist aber nicht gesagt, daß derartige Stämme hämolysierender Streptokokken nur solche sind, die bei Scharlach vorkommen, denn auch solche, die bei Erysipel und Puerperalsepsis gefunden werden, haben ebenfalls die Fähigkeit Toxin zu bilden. —

Man ist daher im Laufe der Jahre davon abgekommen von Scharlach-Streptokokken als solchen zu sprechen, sondern man nimmt heute an, daß jeder hämolysierende, giftbildende Streptokokkus in gegebenem Falle für die Pathogenese eines Scharlachs in Betracht kommen kann, wenn nämlich der betreffende Mensch die dazu geeignete Disposition d. h. Empfindlichkeit gegen das spezielle Streptokokkentoxin hat.

Eine Eigentümlichkeit dieses Streptokokken-Toxins war nun die Tatsache der ungewöhnlich hohen Hitzebeständigkeit, denn dieses Toxin, das im folgenden als „Dick-Toxin" bezeichnet werden soll, vermag bei scharlachempfänglichen Menschen eine Hautreaktion (Dickprobe) auszulösen, deren Zustandekommen erst durch mehrstündliches Erhitzen bei 100° C aufgehoben wird. —

Eine weitere Eigentümlichkeit dieses Giftes ist der Umstand, daß es nur in älteren Kulturen in einem solchen Maße gebildet wird, daß 0,1 cc einer Verdünnung von 1 : 1000 noch eine deutliche Hautreaktion gibt. — Wenn wir auch im Prinzip annehmen müssen, daß alle hämolysierenden Streptokokken dieses Dick-Gift zu bilden im Stande sind, so gibt es zweifellos Streptokokken, die besonders leicht und in großen Mengen auf Bouillon-Nährboden Dick-Toxin bilden können, und gerade diese Stämme sind es, die zur Gewinnung von Antitoxin benutzt werden. —

Ferner gelingt es nicht mit dem Dicktoxin Tiere zu töten. — Ueberhaupt sind Tiere dem Dicktoxin gegenüber praktisch unempfindlich. — Hautreaktionen, in dem Sinne der Dickprobe beim Menschen, gelingt es bekanntlich nur bei ganz wenigen Tieren auszulösen, am besten noch an weißen Ziegen von gewisser Rasse, seltener bei Kaninchen, Schweinen und Pferden. — Es scheint den bisherigen Erfahrungen nach, daß

diese Tiere nur dann auf das Dicktoxin reagieren, wenn sie eine gewisse Allergie gegen Streptokokken erworben haben. — Neugeborene Tiere reagieren jedenfalls nicht. — Töten kann man mit Dicktoxin kein Tier, selbst nicht kleine Mäuse; ein Kaninchen verträgt 20 bis 40 cc intravenös und dann dürfte der Tod leicht auf andere Faktoren zurückgeführt werden können, die durch die große Masse der eingespritzten Bouillon bedingt sind. — Auf Grund dieser und anderer Feststellungen hat man nach dem Vorschlag von Dochez das Dicktoxin nicht als ein echtes Toxin im Sinne des Diphtherietoxins bezeichnet, sondern als ein Toxallergen, das heißt also, als eine Substanz, die nur dann toxisch wirkt, wenn die Bedingung der Allergie gegen dasselbe vorhanden ist. — Am empfänglichsten diesem Gift gegenüber ist der scharlachempfängliche Mensch. — Bei der Schutzimpfung gegen Scharlach mit Dicktoxin ist öfters vorgekommen, daß nur wenige Kubikzentimeter des Giftes eingespritzt ein Krankheitsbild auslösten, daß klinisch ganz dem Scharlach entsprach, aber natürlich nicht infektiöser Natur war. Ein ähnliches Krankheitsbild bei Tieren hervorzurufen ist aber bis jetzt nicht gelungen. — Diese Beobachtung ist eine der wesentlichsten Gründe für die Annahme, daß der toxämische Symptomenkomplex bei Scharlach durch die Reaktion des Organismus gegen dieses Dick-Toxin bedingt ist, und damit in vollem Einklang ist die in den Behringwerken, Marburg, experimentell erwiesene Tatsache, daß ein antitoxisches Pferdeserum nur dann therapeutische Wirkung bei Scharlach hat, wenn es immunisatorisch mit dem Dick-Toxin, das heißt also mit dem Toxin, das sich in älteren etwa 6tägigen Kulturen gebildet hat, hergestellt ist. — Es gibt auch noch andere Streptokokkensera, die eine mehr bakterizide Natur haben; aber diesen Seren fehlt jede therapeutische Einwirkung auf das Symptomenbild des Scharlachs.

Neben diesem Dick-Toxin kommt den Streptokokken noch andere Giftwirkung zu. — So sehen wir, daß Streptokokken, wie z. B. der bekannte Stamm „Aronson", in minimalsten Dosen Versuchstiere wie Mäuse und Kaninchen zu töten im Stande sind, in Vitro aber eine nur schwache Bildung von Dick-Toxin zeigten, während andererseits die bekanntlich gut Dicktoxinbildenden Original-Stämme von Dick und Dochez nur eine relativ geringe Tierpathogenität aufweisen. — Wenn wir solche für Tiere pathogene Streptokokken weiter analysieren, etwa dadurch, daß wir sie, wie Dold vorschlug, le-

bend intrakutan bei Kaninchen oder Meerschweinchen einspritzen, so finden wir pathogene Stämme, die intrakutan nur eine relativ geringgradige Entzündung verursachen, während andere Stämme schwere Nekrosen in kurzer Zeit erzeugen können. —

Es schien zunächst, daß es sich hier um mehr als um einen quantitativen Unterschied handelte, denn vieles sprach dafür, daß wir zunächst einen qualitativen Unterschied annehmen mußten, insofern es Stämme gibt, deren pathologische Wirkung nur auf Endotoxine beruht, während bei anderen pathogenen Stämmen dazu noch die Wirkung eines Ektotoxins in Form eines nekroseerzeugenden Giftes hinzukommt.

Es ist andererseits durch meine ausgedehnten Versuche nachzuweisen, daß die nekrotisierenden Eigenschaften gewisser Streptokokken nur quantitative Ausdrucksformen der gleichen Eigenschaften darstellen, Zellen zu zerstören als deren niedere Stufe wir die Hämolyse ansprechen können.

Alle pathogene Streptokokken hämolysieren; sie erzeugen also Blutgifte. — Aber es sind nicht allein diese Blutgifte, welche die Versuchstiere töten, denn wir kennen Streptokokken, wie z. B. der Stamm „Aronson", die sehr pathogen für Mäuse sind, ohne daß sich nachweisen läßt, daß der Tod der Tiere durch ein Hämotoxin von der Art erfolgt, wie wir es bei den pathogenen Gasbranderregern kennen. — Andererseits gibt es hämolysierende Streptokokken, welche bei intravenöser Injektion Kaninchen in einer Reihe von Tagen töten. — Solche Tiere zeigen nach einigen Tagen deutliche Anzeichen von Anämie z. B. Hämoglobinurie und entwickeln vielfach nach 8 bis 14 Tagen Lähmungen der hinteren Extremitäten, als deren pathologische Ursache sich Nekrose der Psoasmuskulatur nachweisen läßt. Es ist bemerkenswert, daß die auf Anämie beruhende Muskelnekrose zuerst und am stärksten in den Muskeln auftritt, die am meisten beansprucht werden. — Diese Muskelnekrosen dürfen in keiner Weise auf die gleiche Stufe gestellt werden, wie die Nekrose, die wir oben erwähnt haben, und die bei intrakutaner Einspritzung lebender Streptokokken in die Kaninchenhaut hervorgerufen werden kann. —

Wenn wir demnach bisher ein Toxallergen als sogenanntes Dickgift von dem Gift unterscheiden können, welches die Hämolyse macht und vielleicht noch von einem weiteren Gift, welches ein Endtoxin ist und vielleicht ein ausgesprochenes Herzgift darstellt, so müssen wir zunächst noch ein Gift

unterscheiden,, welches in den Geweben starke Nekrose machen kann. —

Wenn man viele hämolysierende Streptokokken auf diese nekrotisierenden Eigenschaften hin untersucht, so findet man im ganzen nur sehr wenige, die diese Eigenschaften in ausgesprochenem Maße haben. —

Es ist selbstverständlich, daß alle solche Streptokokken sehr pathogen sind, doch gehören sie, gemessen an der Zeit, die zur experimentellen Tötung von Versuchstieren benötigt wird, lange nicht zu den virulentesten. —

Ich habe mich nun mit dem Studium dieser nekrotisierenden Streptokokken-Gifte besonders beschäftigt. —

Experimenteller Teil.

Die Herstellung des nekrotisierenden Toxins auf gewöhnlichen flüssigen Nährböden ist bisher noch nicht gelungen und in der Literatur ist bisher kein Verfahren bekannt, dieses Gift von Bakterien getrennt und in reinem Zustand zu gewinnen. —

F. Meyer machte, in seinem unveröffentlichten Vortrag auf dem Deutsch-Russischen Scharlach-Kongreß 1928 in Königsberg, auf die Möglichkeit der Herstellung dieses Giftes aufmerksam und betonte die Bedeutung des mit diesem Toxin hergestellten Antitoxins für die Serumtherapie des Scharlachs besonders dessen Komplikationen und Nachkrankheiten.

Die Schwierigkeit, geeignete Streptokokkenstämme mit nekrotisierenden Eigenschaften zu finden, führten mich zu den Arbeiten von Dold über das gewebsbiologische Verhalten der Streptokokken. —

Nach Dold gehören zum Virulenztypus I diejenigen Streptokokken, die bei intrakutaner Injektion von 0,2 cc frischer lebender Kultur an rasierten weißen Kaninchen nur eine Rötung und geringe Infiltration bewirken; zum Virulenztypus II die Streptokokken, die außer starker Infiltration eine lokalisiert bleibende Nekrose verursachen, und zum Virulenztypus III diejenigen Streptokokken, die eine flache, schnell fortschreitende Nekrose bewirken, und in wenigen Tagen den Tod des Tieres herbeiführen. —

Hierzu stellte Dold fest, daß die Eigenschaften, die dieser Einteilung nach Virulenztypen zu Grunde liegt, konstant sind und sich nach $1^1/_2$ Jahre langer fortgesetzter Züch-

tung noch nicht verloren haben, sodaß also nekrotisierende Streptokokken diese Fähigkeit Nekrose zu machen nicht nur immer behalten, sondern auch die Merkmale des zugehörigen Virulenztypus jedesmal zeigen.

Meine darüber angestellten Versuche, die sich über $1^1/_2$ Jahre ausdehnten, schränken jedoch diese Feststellungen von Dold etwas ein. —

Es ließ sich vielmehr mit den auch von Dold benutzten Stämmen, wie Di 14, Di 22, 1785, FS 1, 111127, Dick I, Dick II, Dochez sowie mit vielen anderen aus etwa 100 verschiedenen Streptokokken ausgesuchten Stämmen nachweisen, daß die 3 von Dold aufgestellten Virulenztypen nur quantitative Ausdrucksformen der gleichen Eigenschaft darstellen, die man durch geeignete Züchtungsbedingungen ineinander überführen kann. —

Experimentell ließen sich hämolysierende Streptokokken vom Virulenztypus I in solche umwandeln, die stärkere Nekrose hervorrufen können und selbst in solche vom Virulenztypus III und umgekehrt: hämolysierende Streptokokken vom Virulenztypus III wurden durch lange Züchtung auf gewöhnlichen Nährböden wie Ascitesagar so abgeschwächt, daß die nekrotisierenden Eigenschaften vollständig verschwanden und die Streptokokken dem Virulenztypus I entsprachen.

In manchen Fällen können die nekrotisierenden Eigenschaften durch geeignete lange Vorbehandlung wieder zum Vorschein gebracht werden, jedoch konnte ich dies durch das zunächst liegende Mittel der wiederholten Mäusepassage nur in unvollkommener Weise oder überhaupt nicht erreichen. — Dagegen hat sich mir ein Verfahren bewährt, über das weiter unten genauer berichtet werden soll. —

In den Hautnekrosen der mit lebenden Streptokokken intrakutan behandelten Kaninchen ist anzunehmen, daß das nekrotisch gewordene Gewebe nicht nur die Streptokokken, sondern auch deren Toxine enthält, sodaß man daran denken könnte aus dem Preßsaft solcher Nekrosestellen das nekrotisierende Toxin zu gewinnen. — Die Gewinnung von Preßsaft aus diesem geringen Material ist jedoch sehr schwierig. Es scheint daher erfolgreicher zu sein, einen günstigen Nährboden herzustellen.

Es erwies sich mir dabei zweckmäßig, solche Nährböden herzustellen, die in ihrem physiologischen und chemischen Aufbau den Verhältnissen im lebenden Körper möglichst nahe kamen, gewissermaßen eine Nekrose in Vitro ermöglichten.

— Aus diesem Grunde wurde davon Abstand genommen, die Nährböden durch Hitze zu sterilisieren, da Versuche zeigten, daß die Hitze Veränderungen des Nährboden bewirkt, welche die Toxinbildung hemmen. — Die Natur dieser Veränderungen bedarf freilich noch weiterer Aufklärung. —

Ich stellte zunächst Versuche mit Nährboden folgender Zusammensetzung an:

A) Frisches steril entnommenes Kaninchenfleisch wurde in ein Kölbchen mit steriler gewöhnlicher Bouillon gebracht, und der Nährboden dadurch beimpft, daß in das Fleisch mittels einer Injektionsspritze etwas von einer Abschwemmung einer 24 Stunden alten Agarkultur des Streptokokkus Nr. 111127 gespritzt wurde. — Außerdem wurden in die Bouillon zerkleinerte Organstückchen (Leber und Milz) von Kaninchen, die auf dieselbe Weise beimpft wurden, in Bouillonkölbchen gebracht. —

B) Zerkleinerte sterile Kaninchen-Organe (Leber und Milz), die auf die oben beschriebene Weise mit einer 24 Stunden alten Agarkultur von Stamm 111127 beimpft wurden, wurden in Kölbchen gelegt, die an Stelle der Bouillon sterile physiologische Kochsalzlösung enthielten. —

C) Frisches steril entnommenes Kaninchenfleisch wurde in ein Kölbchen mit steriler physiologischer Kochsalzlösung gebracht, nachdem das Fleisch wie oben beimpft worden war. —

D) Fein sterilzerhacktes Kaninchenfleisch, das mit gewöhnlicher Bouillon in einem sterilen Mörser verrieben war, wurde mit einer Abschwemmung einer 24 Stunden alten Agarkultur 111127 beimpft. — Außerdem kamen noch steril zerkleinerte beimpfte Organstückchen (Leber und Milz) desselben Kaninchen in das gleiche Kölbchen. — Hier waren also zum Unterschied von A) Fleisch und Organe nicht in Stückchen, sondern fein zerrieben. —

E) Steril entnommenes Kaninchenfleisch wurde in ein Kölbchen mit steriler gewöhnlicher Bouillon gebracht, nachdem es mittelst einer Injektionsspritze mit einer Abschwemmung 24 Stunden alter Agarkultur 111127 geimpft worden war. Dieser Nährboden enthielt also Fleisch allein und in Stückchen. —

F) Sterile Organstückchen (Leber und Milz) von frischen Kaninchen wurden mittels einer Injektionsspritze mit einer

Abschwemmung einer 24 Stunden alten Agarkultur 111127 eingespritzt und in ein Kölbchen mit steriler gewöhnlicher Bouillon hineingelegt. Der Nährboden enthielt also nur Organe und zwar in Stückchen.

G) Steril feingehacktes Kaninchenfleisch, das mit gewöhnlicher Bouillon in einem sterilen Mörser verrieben war, wurde mit einer Abschwemmung einer 24 Stunden alten Agarkultur 111127 beimpft. — Dieser Nährboden entspricht also E, nur mit dem Unterschied, daß das Fleisch zerrieben war.

Ich habe zunächst in dieser Versuchsanordnung den Stamm 111127 benutzt. — Dieser Stamm war aus dem Herzblut eines Patienten im Friedrichshain-Krankenhaus isoliert worden, der an einer Diphtherie gestorben war, die durch eine Streptokokkenendocarditis kompliziert war. Dieser Stamm hatte die Fähigkeit, intrakutan in Mengen von 0,2 cc einer 24-stündigen Bouillonkultur Kaninchen eingespritzt, große fortschreitende Nekrose, und in 2 Tagen den Tod des Tieres zu verursachen. —

Zu bemerken ist, daß das Filtrat einer solchen 24 Stunden alten Kultur des Stammes 111127 in gewöhnlicher Bouillon, sowie Adlershoffscher-Pancreatinbouillon, niemals bei einer Verdünnung von 1:1000 eine nennenswerte Hautreaktion, weder an Ziegen und Kaninchen noch an Menschen bei intrakutaner Injektion, zu geben im Stande war. —

Die in der oben beschriebenen Weise beimpften Nährböden A bis G wurden dann in einen Brutschrank gestellt und bei einer Temperatur von nur 30° C bebrütet. — Vorversuche hatten nämlich gezeigt, daß die Temperatur eine wichtige Rolle spielt, denn bei höherer Temperatur ist zwar deutlicheres Wachstum vorhanden, jedoch ist höhere Temperatur für die Toxinbildung nicht günstig wahrscheinlich wegen der Labilität des nekrotisierenden Toxins. —

Nach 24 Stunden Wachstum wurden die Toxine durch Filtration mit Seitzfilter gewonnen und am nächsten Tag in verschiedenen Verdünnungen einer weißen Ziege intrakutan injiziert. Gleichzeitig wurde durch Kontrolle die Sterilität dieser Filtrate sichergestellt.

Obwohl sich diese Ziege bei einer vorhergehenden Empfindlichkeitsprüfung mit dem amerikanischen Scharlach-Standardtoxin als nicht besonders toxinempfänglich erwiesen hatte, erhielten wir folgendes Resultat:

22. XI. 1928 — Giftprüfung — 111127.

Nährboden	Verdünnungen 1/2000	1/4000	1/8000	1/16000	1/32000	
A	2,0 cm	2,0 cm	1,5 cm	2,0 cm	2,0 cm schwach	Hautreakt.
B	2,5 cm	1,5 cm	1,0 cm	spur	spur	„
C	1,8 cm	1,8 cm	2,0 cm	spur	0	„
D	1,5 cm	1,5 cm	1,5 cm schwach	spur	spur	„
E	2,0 cm	2,5 cm	2,0 cm	1,8 cm	1,5 cm	„
F	2,5 cm	2,5 cm	2,0 cm	2,0 cm	spur	„
G	2,0 cm	3,0 cm	2,5 cm	2,0 cm	2,0 cm	„
american. Standard-toxin	spur	1,0 cm	spur	spur	0	„
Bouillon	1,0 cm	1,0 cm	0	0	0	„

Dieser Versuch zeigte, daß der Nährboden für die Toxinbildung eine wesentliche Rolle spielt, indem günstige Nährböden, in denen die Streptokokken ihre Virulenz behalten und sogar noch steigern, auch für die Toxingewinnung geeignet sind. Sie verschaffen den Streptokokken vermehrte Wachstumsmöglichkeit, sodaß, selbst bei an und für sich geringer Produktion des labilen Toxins, dieses doch durch die Steigerung der Vermehrung genügend angereichert wird, um ihren Nachweis im Filtrat zu ermöglichen.

In dieser Versuchsreihe erkennt man zwar eine Steigerung der Toxinbildung der Streptokokken, aber noch keine nekrotisierende Wirkung des Toxins. Um eine solche darzustellen wurde der Nährboden weiter verbessert, und nach längeren Versuchen mit verschieden hergestellten Nährboden,

erhielt ich die besten Resultate mit folgendem Verfahren:

Eine größere Menge (ca. 4 Kgr.) frisches Pferdefleisch, wurde mittels einer großen Fleischpresse langsam mit steigendem Druck gepreßt. Von dem so gewonnenen Preßsaft verdünnte ich 2 Teile Saft mit 1 Teil physiologischer Kochsalzlösung, dann wurde durch Zusatz von 10 % Natriumcarbonatlösung die Reaktion des saueren Fleischsaftes auf eine pH 7,5 eingestellt und schließlich der Nährboden durch Filtration mittels Seitzfilter entkeimt. — Zu Sicherstellung völliger Keimfreiheit wurde zum Schluß der Nährboden nochmals durch ein de Haen'sches Membranfilter filtriert. - Mit solchem Preßsaftfiltrat füllte ich zur Hälfte Reagenzgläser, die 2 cc Kaninchenserum und 1 cc Menschenblut enthielten. —

Die so vorbehandelten Nährbodenröhrchen wurden dann mit ausgesuchten Streptokokken-Stämmen beimpft und im Brutschrank 24 Stunden bei einer Temperatur von höchstens 30° C gehalten. —

Nach 24 Stunden Wachstum wurde auf neue Preßsaftröhrchen übertragen und nach 24 Stunden wieder eine Preßsaftröhrchenpassage ausgeführt.

Nach jeder Röhrchenpassage wurden Kaninchen intrakutan mit lebender Kultur und mit dem durch doppelten Seitzbakterienfilter keimfrei gemachten Filtrat eingespritzt.

Das Filtrat wurde jedesmal auf Sterilität geprüft und nur dann als keimfrei angesehen, wenn nach 4 Tagen bei 37° C kein Wachstum nachzuweisen war. —

Wir erreichten auf diese Weise nach 3—4 Preßsaftröhrchenpassagen, eine Erhöhung der Toxizität der Streptokokken, verbunden mit einer sehr großen Steigerung der Virulenz. —

Nachdem ich aus zirka 100 Stämmen den besten ausgesucht hatte, stellte ich zahlreiche Versuche mit demselben Resultat an, von dem folgende Protokolle typische Beispiele bilden:

Am 5. 1. 20 wurde ein weißes Kaninchen mit 0,2 cc einer lebenden Kultur von 111127 nach der dritten Passage auf Preßsaftröhrchen intrakutan eingespritzt.

Ein zweites weißes Kaninchen wurde auf rasierte Stelle mit 0,5 cc Kulturfiltrat desselben Röhrchens intrakutan injiziert.

Am nächsten Tag zeigte sich bei dem ersten Kaninchen eine 5 cm große tiefgreifende Nekrose und abends trat der Tod des Tieres ein. —

Bei dem zweiten Kaninchen war nun eine 3 cm große Nekrose vorhanden, die das keimfreie Kulturfiltrat verursacht hatte. —

Dieses Kaninchen blieb am Leben, da das Filtrat, wie die Sterilitätsprüfungen ergaben, keine lebenden Streptokokken enthielten. — Es war also gelungen das Nekrotoxin der Streptokokken von den Bakterien getrennt zu erhalten. —

Zu bemerken ist aber, daß vor der Züchtung in Preßsaftröhrchen eine besondere Vorbehandlung der Stämme unbedingt nötig zu sein scheint.

Diese Vorbehandlung besteht in einer langfortgesetzten jedesmal nach 24 Stunden erfolgten Umzüchtung auf Röhrchen mit je 1 cc alten Menschenserums und 2 cc frischen Kaninchenblutes, wodurch erst die Streptokokken die Eigenschaften erhalten das Nekrotoxin auf den Preßsaftnährboden in für die Filtration genügender Menge zu bilden. —

Da das Nekrotoxin, wie schon F. Meyer betont hat, sehr labil ist, besonders gegen Temperaturerhöhung, so ist auch nötig, die Züchtungstemperatur auf höchstens 30° C zu halten. Das Wachstum ist auch bei dieser Temperatur immer noch sehr reichlich.

Viele hämolysierende Streptokokkenstämme vom Virulenztypus I nach Dold, das heißt Stämme, die nur eine geringe Infiltration und Rötung ohne eine Spur von Nekrose bewirken, zeigten nun nach der oben beschriebenen Vorbehandlung und Züchtung, auf Preßsaftröhrchen nach 3 bis 4 Preßsaftröhrchenpassagen eine solche Zunahme der Virulenz, daß sie bei intrakutaner Einspritzung in die rasierte Haut weißer Kaninchen große Nekrosen bewirkten, sodaß diese Streptokokken demnach also nicht mehr unter dem Virulenztypus I zu klassifizieren wären, sondern unter dem Virulenztypus II und III. — Ein Beispiel ist folgender Versuch vom 20. 1. 29:

Der Scharlach-Streptokokken-Stamm „Freund Nr. 5", der dem Ausfall des Intrakutanversuches an Kaninchen entsprechend dem Virulenztypus I angehörte, wurde 14 Tage lang auf Menschenserum und Kaninchenblut bei täglicher Umzüchtung geführt, und dann wurde nach der dritten Preßsaftröhrchenpassage 0,2 cc einer 24-stündigen lebenden Kultur intrakutan einem Kaninchen eingespritzt. — Am nächsten Tage zeigte dieses Kaninchen eine 3 cm große flache Nekrose, die am 5.—6. Tag abgestoßen wurde.

Aehnliche Resultate erhielt ich bei der Prüfung einer großen Zahl von Scharlach-Streptokokken-Stämmen, die alle dem Virulenztypus I nach Dold entsprochen hatten.

Diese Versuche beweisen, daß die drei Virulenztypen nicht konstante Eigenschaften der Streptokokken darstellen.

Die Entstehung nekrotisierender Eigenschaften der Streptokokken ist fast immer von einer Steigerung der Virulenz der Stämme begleitet. — So konnte beobachtet werden, daß die Stämme, welche fortschreitende Nekrosen bewirken, in kurzer Zeit das Tier zu töten imstande sind. Aber diese Virulenz geht nicht immer mit den nekrotisierenden Eigenschaften parallel, sondern die Virulenz der Stämme kann so groß werden, daß eine Infiltration mit nachfolgender Nekrosebildung zeitlich nicht mehr zur Entwicklung kommen kann.

Eine solche Beobachtung konnte ich mit dem Stamm 111127 machen: Am 28. 1. 29 wurde ein unvorbehandeltes weißes Kaninchen mit 0,2 cc einer 24 Stunden alten Kultur des Stammes 111127 nach dessen vierter Preßsaftröhrchenpassage, intrakutan eingespritzt.

Am nächsten Tag, nach zirka 20 Stunden, wurde das Tier tot gefunden und zeigte auf der Impfstelle eine 5 cc große Hautrötung ohne Nekrose.

Die gleiche Beobachtung machte ich mit anderen Stämmen wie der Stamm „Dochez", Di 14, sowie mit drei Stämmen, die mir Herr Prof. F. Meyer freundlichst zur Verfügung gestellt hatte.

Ich habe nun noch einige Versuche zu der Frage angestellt, ob es möglich wäre das Nekrotoxin zu konzentrieren.

Wie schon F. Meyer betont hat, ist das Nekrosetoxin sehr labil. — Es ist sehr empfindlich gegen die Einwirkung von Chemikalien, gegen höhere Temperatur und ist auch selbst beim kühlen Lagern nicht haltbar. —

Die Wirkungsgrenze bei der Aufbewahrung im Eisschrank beschränkt sich nur auf 2 bis 3 Tage; über diese Zeit hinaus kann man die nekrotisierende Eigenschaft des Toxins nicht erhalten. —

Jedes Konservierungsmittel wie z. B. Phenol, Formalin usw. schädigt in kurzer Zeit die nekrotisierende Wirkung, sodaß es auch auf diese Weise nicht möglich ist, das Toxin zu konservieren. —

Eine Temperaturerhöhung bis 40° C schwächt sofort das Toxin, sodaß die nekrotisierende Eigenschaft verschwindet. — Ein Toxin, das vor der Erwärmung Nekrose hervorrief,

bewirkt nach einer halbstündigen Erwärmung auf 40° nur noch eine große Rötung in der Haut des Kaninchen. —

Wegen dieser Labilität des Nekrosetoxin ist natürlich eine Konzentrierung sehr schwer, und es ist bis jetzt noch nicht gelungen ein Streptokokkentoxin zu konzentrieren ohne dessen nekrotisierende Eigenschaften zu vernichten. —

Neuere englische Arbeiten, in denen die Autoren sich bemühten, durch Konzentrationsverfahren Nekrosetoxin zu gewinnen, zeigen ebenfalls die bisherige Unmöglichkeit.

Hartley, z. B. gewann aus dem Filtrat junger Kulturen von 18 Stunden, durch Ammoniumsulfat- und Essigsäure-Fällung ein konzentriertes Toxin, mit dem er bei intravenöser Injektion von 0,5 cc den Tod eines Kaninchens zu bewirken vermochte. — Intrakutan eingespritzt aber gab das Toxin nur eine Hautreaktion in dem Sinne der Dickprobe, und keine Nekrose. —

Hierzu möchte ich die Bemerkung machen, daß das Dicktoxin, wenn auch nur in geringer Menge auch in jungen Kulturen gebildet wird. So ist auch bei diesen Versuchen zunächst nur eine Konzentrierung des Dicktoxins erreicht worden, da durch die chemischen Eingriffe das Nekrosetoxin zerstört werden mußte. —

Aber in Hartley's Versuchen besitzt das so konzentrierte Toxin auch die Fähigkeit ein Kaninchen zu töten. —

Man muß es vorderhand dahingestellt sein lassen, ob hier nur die Wirkung eines Toxins vorliegt, oder ob es sich um zwei Gifte handelt: das konzentrierte eigentliche Dicktoxin und ein tötlich wirkendes Toxin, welches entweder dem Gift entspricht, welches, wie beim Stamm Aronson die Tiere tötet (Herzgift?) oder welches als ein Hämotoxin wirkt.

Jedenfalls hat die Konzentrierung nicht zu einer Nekrosewirkung geführt, denn dieses Nekrosetoxin ist so labil, daß es durch die Einwirkung der angegebenen Chemikalien sicher zerstört wurde.

Pulvertaft hat sich ebenfalls mit der Konzentrierung von Streptokokkengiften beschäftigt. — Es hat folgende Methode angewandt: das Filtrat ganz junger, nur 18-stündiger Kultur wurde in der Kälte mit absolutem Aethylalkohol gefällt. — Das ausgefällte Material wurde wieder gelöst und stellte ein konzentriertes Toxin dar, von dem schon 0,2 cc Gift intravenös injiziert den Tod eines allerdings kleinen

Kaninchen verursachte, intrakutan injiziert aber ebenfalls keine Nekrose bewirkte, sondern nur wiederum eine Hautreaktion wie bei Hartley. —

Auch hier muß man die gleichen obererwähnten Fragen noch offen lassen, und es bedarf noch weiterer experimenteller Arbeit um die Einheitlichkeit oder die Verschiedenheit der Streptokokkentoxine sicher zu stellen. —

Jedenfalls glaube ich sagen zu dürfen, daß eine erfolgreiche Konzentrierung des Nekrosetoxins der Streptokokken erst dann in Angriff genommen werden kann, wenn Verfahren bekannt sind, dasselbe in genügender Menge als keimfreies Filtrat zu erhalten, wozu die in dieser Arbeit angegebene Methode vielleicht als Wegweiser dienen kann. —

Zusammenfassung:

1. Viele Streptokokken zeigen in ihren Eigenschaften eine gewisse Veränderlichkeit, sodaß die drei von Dold festgestellten Virulenztypen nur bedingt Geltung haben, denn durch besondere Züchtungsverfahren lassen sich Stämme von einem Virulenztypus in einen anderen umwandeln.

2. Die Streptokokkenstämme, die Hautnekrosen bewirken, bilden ein Gift, welches bei intrakutaner Einspritzung ebenfalls Hautnekrose erzeugt.

3. Für die Gewinnung des Nekrosetoxins der Streptokokken spielt der Nährboden eine große Rolle. —

4. Der Nährboden für die Gewinnung des Nekrosetoxins muß in seiner physiologischen und chemischen Beschaffenheit den Verhältnissen im lebenden Körper möglichst nahe kommen. Dieser Forderung entsprach Pferdefleischpreßsaft, das nicht durch Hitze sterilisiert, sondern durch mehrmalige Filtration entkeimt wurde.

5. Für eine reichliche Nekrosetoxinbildung empfiehlt es sich, die nekrotisierenden Streptokokkenstämme längere Zeit auf Nährböden mit Menschenserum und Kaninchenblut zu züchten.

6. Durch fortgesetzte Umzüchtung auf Pferdefleischpreßsaft-Nährböden steigt die Virulenz der Streptokokken sehr stark an. Nach einer solchen Vorbehandlung kann das keimfreie Filtrat 24 Stunden alter Streptokokkenkulturen auf Pferdefleischpreßsaft-Nährboden das Nekrotoxin enthalten und auch Hautnekrosen bewirken.

7. Die Züchtungstemperatur der Streptokokkenstämme für die Gewinnung des Nekrosegiftes darf wegen dessen Labilität höchstens 30° C betragen.

8. Das Nekrosetoxin wird auch durch Chemikalien wie Ammoniumsulfat, Essigsäure, Aethylalkohol, Phenol, Formalin usw. vernichtet. —

9. Die nekrotisierende Wirkung des Nekrosetoxins läßt sich höchstens 3 Tage erhalten. Eine längere Konservierung ist bis jetzt nicht möglich gewesen. —

10. Eine Konzentrierung des Nekrosetoxins ist gleichfalls nicht gelungen, da die dazu benutzten Chemikalien das labile Toxin schädigen.

Vorliegende Arbeit wurde im Institut für Hygiene der Universität Marburg und im Institut für experimentelle Therapie „Emil von Behring“ vom März 1928 bis November 1929 auf Veranlassung von Herrn Geheimrat Prof. Dr. Bonnhoff unter Leitung von Herrn Prof. Schmidt-Schleicher angefertigt.

Ich möchte nicht versäumen, an dieser Stelle,

Herrn Prof. Dr. H. Schmidt-Schleicher,

für das äußerst liebenswürdige Entgegenkommen und die stete gütige Unterstützung bei der Ausführung dieser Arbeit meinen herzlichsten Dank auszusprechen. —

Ferner bin ich den Herren Professoren der medizinischen Fakultät verbunden für die reichen Anregungen, die ich in ihren Vorlesungen und Uebungen empfangen habe. —

Literatur.

Verhandlung des Deutsch-Russischen Scharlach-Kongreß 1928 in Königsberg: S. 71, 75, 80, 88, 98, 108, 120, 127, 133, 135, 144, 147, 156, 158, 159, 160, 162, 167, 177, 183, 186, 189, 193, 205, 209, 218, 219, 233, 247, 251, 256, 263, 266, 357. — Bürgers: Kl. W. 1928, Nr. 7. — Bürgers u. Wohlfeil: Kl. W. 1928, Nr. 9. — Becker: Centr. Bl. f. Bakt. 1927, Bd. 102, S. 102, S. 348. — Brunthaler u. Wülfing: D. m. W. 1927 Nr. 11. — v. Bormann: D. m. W. 1927, Nr. 28. — Dold: D. m. W. 1927, Nr. 28. — Deicher: Zeitschr. f. Hyg. Bd. 108, S. 167, Kl. W. 1927 Nr. 50, Jahrbuch f. Kind. Heilk. 1926, Bd. CXII, S. 74. — Friedemann und Deicher: D. m. W. 1925, Nr. 46, 47; Zeitschr. f. ges. Krankenwesen 1926, XXII, Heft 11, S. 334; Ther. d. Gegenw. 1927, Heft 6; D. m. W. 1926, Nr. 51; D. m. W. 1927, Nr. 28; Zeitschr. f. Hyg. 1927, Bd. 108, S. 181 u. 192. — Fox, Iris u. Stone Jour. of. Path. Bact. 1927, XXX, Nr. 2. — Hektoen, L. Jour. of the Am. med. Assoc. 1923, Vol. 80, pp. 84—87. — Hach, W. I. u. Bordozilowskaja: Zeitschr. f. Hyg. 1926, Bd. 106, S. 232. — Hartley: Brit. Journ. exper Path. 1928 IX. 259.—Kirkbride M. u. Wheeler M.: The journ. of. immunol 1927, Vol. XIII, vol. 89, pp. 1394. — Louros u. Scheyer: Centr. Bl. f. Bakt. usw. 1927, Bd. 102, S. 385. — Meyer, S.: Zeitschr. f. Kind. 1927 Bd. 43, S. 258.— Mandelbaum: Münch. m. W. 1927 Nr. 41. — Meyer, S.: Zeitschr. f. Kind. 1927, Bd. 45. — Pulvertaft: The Lancet 1929. — Szirmai, F.: Jahrb. f. Kind. Bd. CXVII—1927. Kirchner: Zeitschr. f. Immun. 1928, Bd. 55, Heft 1/2. — Stössner: D. m. W. 1926 Nr. 35. — Schaber: Münch. med. W. 1927 Nr. 36. — Sindoni: D. m. W. 1925 Nr. 23.

Lebenslauf.

Ich wurde geboren am 12. Juli 1901 zu Sullana, Piura, Peru, Südamerica als ältester Sohn des Kaufmanns Otto Tönsmann, und seiner Ehefrau Rosa Tönsmann geb. Gonzales. —

Ich bin preußischer Staatsangehöriger. — Ich besuchte von 1908 bis 1913 die Schule in Piura; alsdann bereitete ich mich zur Aufnahmeprüfung am Colegio Nacional de Guadalupe in Lima vor, wo ich im Jahre 1921 die Reifeprüfung bestand. —

Dann kam ich nach Deutschland und wurde im Winterhalbjahr 1922/23 als Gasthörer der Marburger medizinischen Fakultät zugelassen. So studierte ich 3 Semester bis ich am 7. Juni 1924 als vollimmatrikulierter Student eingeschrieben wurde. —

Nachdem ich am 2. März 1926 eine Ergänzungsprüfung in Latein am hiesigen Realgymnasium ablegte, bestand ich die ärztliche Vorprüfung am 6. November 1926. — Dann studierte ich weitere 5 Semester an hiesiger Universität bis ich am 15. August 1929 die ärztliche Prüfung bestand. —

Ich habe hier gehört und praktiziert bei den Herren:

Prof. v. Auwers, Prof. Bonhoff, Prof. Burckhardt, Prof. Claussen, Prof. Dittler, Prof. Freudenberg, Prof. Göppert, Prof. Gürber, Prof. Grüter, Prof. Hildebrand, Prof. Korschelt, Prof. Kutscher, Prof. Kehrer, Prof. Kretschmer, Prof. Klapp, Prof. Läwen, Dr. Loebell, Prof. E. Müller, Prof. W. Müller, Prof. Moog, Prof. Naujoks, Prof. Ruete, Prof. Schäfer, Prof. Strecker, Prof. Schwenkenbecher, Prof. Schenk, Prof. H. Schmidt, Prof. Uffenorde, Prof. Veit, Prof. Versé und Prof. Wiedhopf.